

## Japanese Laid-Open Patent Publication

Publication Number: Heisei 10 (1998) 227755

Date of Publication: August 25, 1998

### [Title of Invention] Biosensor

#### [Abstract]

#### [Problem]

A biosensor is needed which can measure the concentration of a substrate such as glucose without being affected by the presence of oxygen dissolved in the sample liquid.

#### [Means of Solution]

The biosensor of the present invention comprises an electrically insulating base plate, an electrode system having a working electrode and a counter electrode formed on said base plate, and a reaction layer formed on said electrode system, wherein said reaction layer contains a dehydrogenase and electron acceptor, said dehydrogenase being combined with pyrroloquinoline quinone as coenzyme.

#### [Claims]

1. A biosensor comprising an electrically insulating base plate, an electrode system having a working electrode and a counter electrode formed on said base plate, and a reaction layer formed on said electrode system, said sensor being characterized by said reaction layer that contains dehydrogenase and electron acceptor, said dehydrogenase being combined with pyrroloquinoline quinone as a coenzyme.
2. The biosensor according to claim 1, wherein said reaction layer further contains pyrroloquinoline quinone.
3. The biosensor according to claim 2, wherein the content of said pyrroloquinoline quinone is from  $1.5 \times 10^{-6}$  to  $1.5 \times 10^{-4}$  grams per square centimeter of the reaction layer.
4. The biosensor according to claim 1 or 2, wherein a dehydrogenase, which is combined with said pyrroloquinoline quinone as coenzyme, is glucose dehydrogenase or fructose dehydrogenase.
5. The biosensor according to claim 4, wherein the quantity of said glucose dehydrogenase is from 1 unit to 200 units per square centimeter of the reaction layer.

#### [Detailed Description of the Invention]

##### [0001]

##### [Technical Field of the Invention]

This invention relates to a biosensor which can quantitatively measure a specified ingredient in a living-body sample such as blood or urine; or a raw material or product in the food industry including fruit juice quickly, easily, and with a high degree of precision.

##### [0002]

##### [Prior Art]

Biosensors which can quantitatively measure a specified ingredient in living-body samples or food without diluting or stirring the sample liquid have been proposed. For example, in the official publication of applied patent Heisei 3 (1991) 202764, a biosensor has been

disclosed in which an electrode system is formed on an insulating base plate by screen printing or other method and a reaction layer including an oxidoreductase and electron acceptor. This biosensor quantitatively measures the concentration of a specified ingredient in the sample as follows: First, the reaction layer is dissolved by dropping the sample onto the reaction layer, and an enzyme reaction proceeds between the specified ingredient in the sample liquid and the oxidoreductases in the reaction layer. This enzyme reaction reduces the electron acceptor. After a short interval, a voltage applied across the sensor electrodes electrochemically oxidizes the reduced electron acceptor. The concentration of the specified ingredient in the sample liquid is obtained quantitatively from the oxidation current of this reaction.

[0003]

[Problems to be Solved by the Invention]

It is known that among such biosensors, glucose oxidase as an oxidoreductase is commonly used to detect glucose. When glucose oxidase is used, however, the electron acceptor is reduced as part of the enzyme reaction, as is the enzyme dissolved in the sample liquid. Although the reduced electron acceptor can be readily oxidized electrochemically, hydrogen peroxide, a reduced byproduct of dissolved oxygen, cannot. Therefore, the value of the oxidation current obtained by applying a voltage across the sensor electrodes corresponds to the degree of oxidation of the reduced electron acceptor, not including the degree of oxidation of the hydrogen peroxide. The original concentration of the specified ingredient, accordingly, cannot be measured accurately using the obtained value of the oxidation current. To gain an accurate figure for the concentration of the specified ingredient, a preparatory process such as prior quantitative measurement of dissolved oxygen in the sample liquid was needed. This invention aims to offer a biosensor which can precisely measure the concentration of a specified ingredient such as glucose without being influenced by the presence of oxygen dissolved in the sample liquid.

[0004]

[Means of Solving the Problem]

To solve the above-mentioned problem, the biosensor of this invention comprises an electrically insulating base plate, an electrode system having a working electrode and a counter electrode formed on said base plate, and a reaction layer formed on said electrode system, wherein said reaction layer contains dehydrogenase and an electron acceptor, said dehydrogenase being combined with pyrroloquinoline quinone as a coenzyme.

[0005]

[Embodiment of the Invention]

The biosensor of the invention is characterized by the reaction layer of the sensor containing dehydrogenase combined with pyrroloquinoline quinone as a coenzyme. The dehydrogenase that is combined with pyrroloquinoline quinone as a coenzyme reduces only the electron acceptor when the enzyme acts on the specified ingredient. Accordingly, the concentration of the specified ingredient can be measured accurately from the value of the oxidation current. As examples of dehydrogenase combined with pyrroloquinoline quinone as a coenzyme, glucose dehydrogenase and fructose dehydrogenase are included. Their optimal concentration is 1 to 200 units per square centimeter of the reaction layer; more preferably 4 to 100 units. One unit means the amount of oxidoreductase able to oxidize of 1 micro mole of the specified ingredient in one minute. If the content of glucose dehydrogenase is less than 1 unit per square centimeter of reaction layer, the above-mentioned oxidation time is prolonged to several minutes. If the amount of glucose dehydrogenase exceeds 200 units per square centimeter of the reaction layer, the production costs rise and the response current tends to disperse because the reaction layer cracks easily during manufacture.

[0006]

The reaction layer of this invention should ideally contain pyrroloquinoline quinone in addition to above-mentioned dehydrogenase, since the detection sensitivity improves and the concentration of the specified ingredient can be detected over a wider range. The sodium salt of pyrroloquinoline quinone can be used as the pyrroloquinoline quinone. The amount of pyrroloquinoline quinone is ideally  $1.5 \times 10^{-6}$  to  $1.5 \times 10^{-4}$  grams per square centimeter of the reaction layer; more preferably  $1.0 \times 10^{-5}$  to  $8.0 \times 10^{-5}$  grams. Furthermore, the reaction layer of this invention contains an electron acceptor. As examples of electron acceptors, ferricyanide ion, p-benzoquinone and its derivatives, phenazine methosulfate, methylene blue, and ferrocene and its derivatives are included. One or more of these are used as the electron acceptor. Ferricyanide ion shows the best performance.

[0007]

The reaction layer of the biosensor used in this invention may contain hydrophilic macromolecules in addition to the above-mentioned enzyme and electron acceptor. By adding a hydrophilic macromolecule to the reaction layer, detachment of the reaction layer from the surface of the electrode system can be prevented. Furthermore, cracking of the reaction layer is prevented, contributing overall to improved reliability of the biosensor. As examples of hydrophilic macromolecules, carboxymethyl cellulose, hydroxyethyl cellulose, hydroxypropyl cellulose, methyl cellulose, ethyl cellulose, ethyl hydroxyethyl cellulose, carboxymethylethyl cellulose, polyvinylpyrrolidone, polyvinyl alcohol, polyamino acids such as polylysine, polystyrene sulfonic acid, gelatin and its derivatives, acrylic acid and its salts, metaacrylic acid and its salts, starch and its derivatives, and anhydrous maleic acid and its salts are included. Carboxymethyl cellulose shows the best performance. There are two methods for the measurement of oxidization current: the two-electrode method, in which only a working electrode and a counter electrode are used; and the more accurate three-electrode method, in which a reference electrode is added.

[0008]

[Embodiment Examples]

The invention will be hereafter described precisely using specific examples of embodiments. Figure 1 is the outline ground plan of the biosensor of this invention without the reaction layer. Leads 2 and 3 are formed on a base plate 1 made of polyethylene terephthalate by printing silver paste using screen printing. Working electrode 4 is then formed on base plate 1 by printing electroconductive carbon paste containing a resin binder. This working electrode makes electrical contact with lead 2. Furthermore, an insulating layer 6 is formed on the base plate 1 by printing insulating paste. Insulating layer 6 covers the peripheral part of working electrode 4, keeping the area of exposed part of working electrode 4 constant. A ring-shaped counter electrode 5 is formed on base plate 1 by printing electroconductive carbon paste containing resin binder so as to make electrical contact with lead 3. A synthetic resin board of such as polyethylene terephthalate is used as the insulating base plate. For the above-mentioned leads and electrodes, platinum, gold, palladium, etc. may also be used in addition to silver and carbon. Figure 2 shows a longitudinal section of a biosensor of this invention. As shown in Fig. 1, a reaction layer 7 containing enzymes and an electron acceptor is formed on insulating base plate 1 on which the electrode system is formed.

[0009]

[Embodiment Example 1]

On the electrode system of the base plate in Fig. 1, reaction layer 7 was formed by dropping a liquid mixture of glucose dehydrogenase (hereafter abbreviated to GDH) and potassium ferricyanide onto the base plate. The quantity of GDH contained in reaction layer 7 was 30 units per square centimeter of the reaction layer. Next, an aqueous solution of glucose was dropped onto reaction layer 7. When a sample liquid containing glucose is supplied to the

reaction layer, glucose in the sample is oxidized by the glucose dehydrogenase. At the same time, the electron acceptor in the reaction layer is reduced. One minute after dropping the liquid, a voltage of +0.5 V was applied to the working electrode 4 with reference to the counter electrode. The current was measured five seconds later. Because this current is proportional to the concentration of the generated reduced electron acceptor, that is, to the concentration of the specified ingredient in the sample liquid, the glucose concentration in the sample can be obtained by measuring the current. The samples were divided into two groups: the dissolved oxygen concentration was about 30 mmHg in one group and about 180 mmHg in the other. The glucose concentration in the sample was varied in each group. The results demonstrated a correlation between response current and glucose concentration. The linearity was fairly good regardless of the concentration of dissolved oxygen.

[0010]

[Example for Comparison 1]

Reaction layer 7 was formed in the same manner as in Embodiment Example 1 with the exception that glucose oxidase was used instead of glucose dehydrogenase. The correlation between the response current and glucose concentration was examined using the same samples as in Embodiment Example 1. The results revealed that the obtained response current varied according to the dissolved oxygen concentration with a slight tendency for a higher dissolved oxygen concentration to result in a smaller response current.

[0011]

[Embodiment Example 2]

An aqueous solution containing GDH, potassium ferricyanide, and pyrroloquinoline quinone (hereafter abbreviated to PQQ) was dropped onto the base plate shown in Fig. 2. Reaction layer 7 was then formed by drying the solution. The amount of GDH and PQQ contained in reaction layer 7 was 20 units and  $4.5 \times 10^{-5}$  grams per square centimeter of the reaction layer, respectively. The correlation between response current and glucose concentration was also examined using the same samples as in Embodiment Example 1. A much higher degree of correlation than in Embodiment Example 1 was obtained between response current and glucose concentration.

[0012]

[Embodiment Example 3]

An aqueous solution containing fructose dehydrogenase (hereafter abbreviated to FDH) and potassium ferricyanide was dropped onto the base plate 1 shown in Fig. 2. Reaction layer 7 was then formed by drying the solution. The correlation between response current and glucose concentration was also examined using the same samples as in Embodiment Example 1. A high correlation was obtained between response current and glucose concentration. In addition, this result was not influenced by the concentration of dissolved oxygen in the sample. Furthermore, it was recognized that the response improved when PQQ was added to the reaction layer.

[0013]

[Effect of the Invention]

According to this invention, a new biosensor can be obtained by which a specified ingredient contained in a living-body sample such as blood or urine; or samples of materials or products in the food industry can be measured accurately and rapidly.

[Brief Explanation of Drawings]

[Figure 1]

Figure 1 is an outline ground plan of an embodiment of the invention with the reaction layer omitted.

[Figure 2]

Figure 2 is a longitudinal section of the main part of the biosensor.

[Explanation of Marked Parts]

- 1 Electrically insulating base plate
- 2 and 3 Leads
- 4 Working electrode
- 5 Counter electrode
- 6 Insulating layer
- 7 Reaction layer

FIG. 1

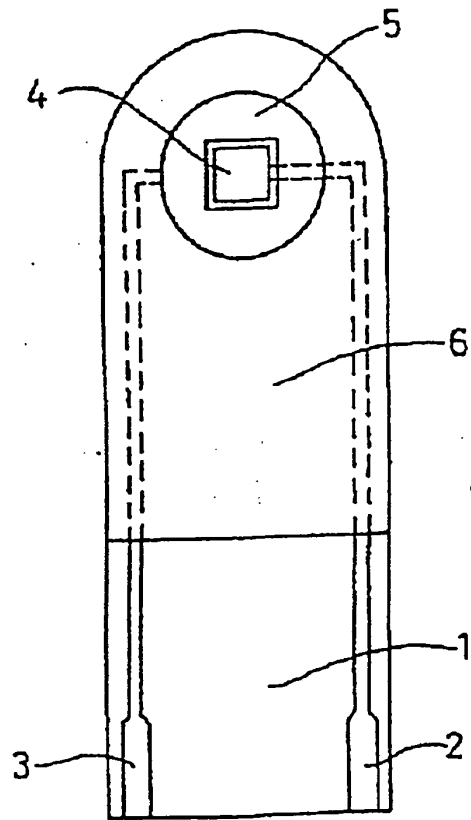
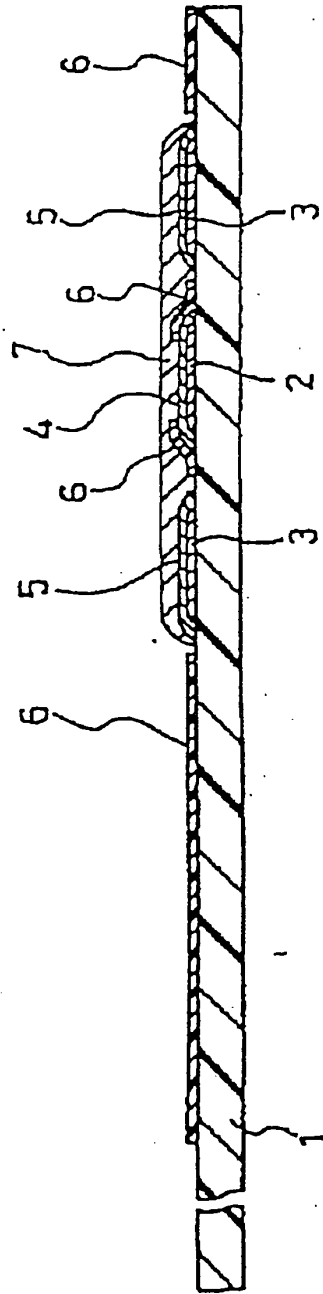


FIG. 2



(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **10227755 A**

(43) Date of publication of application: **25 . 08 . 98**

(51) Int. Cl.

**G01N 27/327**  
**C12Q 1/32**

(21) Application number: **09030239**

(22) Date of filing: **14 . 02 . 97**

(71) Applicant: **MATSUSHITA ELECTRIC IND CO LTD**

(72) Inventor: **YOSHIOKA TOSHIHIKO**  
**TSUJI SATOKO**  
**NANKAI SHIRO**

(54) **BIOSENSOR**

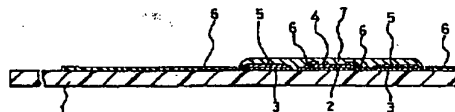
accurately.

(57) Abstract:

COPYRIGHT: (C)1998,JPO

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To avoid effect of dissolved oxygen, by forming a reaction layer containing dehydrogenase and electron acceptor which are combined using pyrrolo quinoline quinone as coenzyme on a electrode system consisting of an action electrode and a counter electrode on a substrate.

**SOLUTION:** Leads 2, 3 are formed on an electrical insulating substrate 1 in screen printing method of silver paste, and an action electrode 4 which connects with the lead 2 is formed in printing method of conductive carbon paste. An insulating layer 6 is formed on the substrate 1 in printing method of insulating paste to cover outer peripheral of the action electrode 4, and a counter electrode 5 which connects with the lead 3 is formed in printing method of conductive carbon paste. A reactive layer 7 is formed on the substrate 1 on which electrodes are formed. The reactive layer 7 contains dehydrogenase and electron acceptor which are combined using pyrrolo quinoline quinone as coenzyme, only the electron acceptor is reduced following enzyme reaction of the reactive layer with matrix, and therefore, concentration of the matrix can be accurately measured. Thus, matrix in a biomedical sample or specimen such as food material can be measured





(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-227755

(43) 公開日 平成10年(1998) 8月25日

(51) Int.Cl.<sup>6</sup>

識別記号

F I

G 0 1 N 27/327

G 0 1 N 27/30

3 5 3 T

C 1 2 Q 1/32

C 1 2 Q 1/32

審査請求 未請求 請求項の数 5 O L (全 4 頁)

(21) 出願番号 特願平9-30239

(22) 出願日 平成 9 年(1997) 2 月14日

(71) 出願人 000005821

松下電器産業株式会社

大阪府門真市大字門真1006番地

(72) 発明者 吉岡 俊彦

大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器  
産業株式会社内

(72) 発明者 辻 里子

大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器  
産業株式会社内

(72) 発明者 南海 史朗

大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器  
産業株式会社内

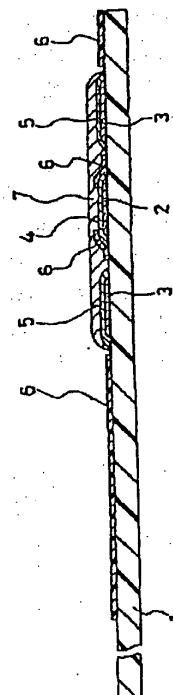
(74) 代理人 弁理士 東島 隆治 (外 1 名)

(54) 【発明の名称】 バイオセンサ

(57) 【要約】

【課題】 試料液中の溶存酸素の影響を受けずにグルコースなどの基質濃度を正確に測定できるバイオセンサを提供する。

【解決手段】 本発明によるバイオセンサは、電気絶縁性の基板、前記基板上に形成された作用極と対極を有する電極系、および前記電極系上に形成された反応層を具備し、前記反応層が、ピロロキノリンキノンを補酵素として結合したデヒドロゲナーゼおよび電子受容体を含む。



1: 電気絶縁性の基板  
4: 作用極  
5: 対極  
7: 反応層

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 電気絶縁性の基板、前記基板上に形成された作用極と対極を有する電極系、および前記電極系上に形成された反応層を具備し、前記反応層が、ピロキノリンキノンを経補酵素として結合したデヒドロゲナーゼおよび電子受容体を含有することを特徴とするバイオセンサ。

【請求項2】 前記反応層が、さらにピロキノリンキノンを経含有する請求項1記載のバイオセンサ。

【請求項3】 前記ピロキノリンキノンの含有量が、反応層1平方センチメートル当たり、 $1.5 \times 10^{-6} \sim 1.5 \times 10^{-4}$  gである請求項2記載のバイオセンサ。

【請求項4】 前記ピロキノリンキノンを補酵素として結合したデヒドロゲナーゼが、グルコースデヒドロゲナーゼまたはフルクトースデヒドロゲナーゼである請求項1または2記載のバイオセンサ。

【請求項5】 前記グルコースデヒドロゲナーゼの含有量が、反応層1平方センチメートル当たり1ユニットから200ユニットである請求項4記載のバイオセンサ。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、血液、尿等の生体試料、食品工業における原料や製品、さらに果汁等の試料中に含まれる基質（特定成分）を高精度で、迅速かつ容易に定量できるバイオセンサに関する。

## 【0002】

【従来の技術】 生体試料および食品中の特定成分（基質）を、試料液の希釈および攪拌などを行なうことなく、簡易に定量し得るバイオセンサが提案されている。その一例として、特開平3-202764号公報には、絶縁性基板上にスクリーン印刷などの方法によって電極系を形成し、この電極系上に酸化還元酵素および電子受容体を含有する反応層を形成したバイオセンサが開示されている。このバイオセンサは、以下のようにして、試料中の基質濃度を定量する。まず、試料液をバイオセンサの反応層上に滴下することにより、反応層が溶解し、試料液中の基質と反応層の酸化還元酵素との間で酵素反応が進行する。この酵素反応に伴い、電子受容体が還元される。一定時間後、センサの電極に電圧を印加して、この還元された電子受容体を電気化学的に酸化し、このとき得られる酸化電流値から試料液中の基質濃度を定量することができる。

## 【0003】

【発明が解決しようとする課題】 このようなバイオセンサのうち、グルコースセンサには、一般に酸化還元酵素としてグルコースオキシダーゼを用いることが知られている。しかし、グルコースオキシダーゼを用いると、酵素反応に伴い電子受容体が還元されると同時に、試料液中の溶存酸素も還元される。電子受容体の還元体は、電気化学的に容易に酸化することができるが、溶存酸素

の還元体である過酸化水素は、容易に酸化できない。そのため、センサの電極に電圧を印加して得られる酸化電流値は、電子受容体の還元体を酸化した量に相当し、過酸化水素を酸化した量は含まれない。よって、得られる酸化電流値から、もとの基質濃度を正確に定量することはできない。基質濃度を正確に定量するためには、試料液の溶存酸素量を予め定量するなどの操作を必要とした。本発明は、試料液中の溶存酸素の影響を受けずにグルコースなどの基質濃度を正確に測定できるバイオセンサを提供することを目的とする。

## 【0004】

【課題を解決するための手段】 上記課題に鑑み、本発明のバイオセンサは、電気絶縁性の基板、前記基板上に形成された作用極と対極を有する電極系、および前記電極系上に形成された反応層を具備し、前記反応層が、ピロキノリンキノンを補酵素として結合したデヒドロゲナーゼおよび電子受容体を含有する。

## 【0005】

【発明の実施の形態】 本発明のバイオセンサは、その反応層にピロキノリンキノンを補酵素として結合したデヒドロゲナーゼ含有することを特徴とする。このピロキノリンキノンを補酵素として結合したデヒドロゲナーゼは、基質との酵素反応に伴い電子受容体のみを還元する。そのため、得られる酸化電流値から基質の濃度を正確に定量することができる。このようなピロキノリンキノンを補酵素として結合したデヒドロゲナーゼには、グルコースデヒドロゲナーゼやフルクトースデヒドロゲナーゼが挙げられる。それらの含有量は、反応層1平方センチメートル当たり、1～200ユニットが好ましい。さらに好ましくは、4～100ユニットである。ただし、1ユニットは、 $1 \mu\text{mol}$ の基質を1分間で酸化させる酸化還元酵素の量を表す。グルコースデヒドロゲナーゼの含有量が、反応層1平方センチメートル当たり1ユニット未満では、測定時に数分以上の時間が必要となる。また、グルコースデヒドロゲナーゼの含有量が、反応層1平方センチメートル当たり200ユニットを上回ると、製造コストが高くなり、さらに反応層形成時に、反応層が割れて応答電流値にばらつきを生じ易くなる。

【0006】 本発明によるバイオセンサの反応層が、上記したデヒドロゲナーゼに加えて、さらにピロキノリンキノンを含有すると、検出感度が向上し、より広範な基質濃度域に対応できるようになるため好ましい。ピロキノリンキノンとしては、ピロキノリンキノンのナトリウム塩を用いることができる。さらに、ピロキノリンキノンの含有量は、反応層1平方センチメートル当たり、 $1.5 \times 10^{-6} \sim 1.5 \times 10^{-4}$  gであることが好ましい。より好ましくは $1.0 \times 10^{-5} \sim 8.0 \times 10^{-5}$  gである。さらに、本発明による反応層は、電子受容体を含有する。電子受容体としては、フェリシアンイ

オン、p-ベンゾキノンおよびその誘導体、フェナジメトサルフェート、メチレンブルー、フェロセンおよびその誘導体が挙げられる。電子受容体は、これらの1種またはそれ以上が用いられる。特に、フェリシアンイオンを用いることが好ましい。

【0007】本発明によるバイオセンサの反応層には、上記酵素類や電子受容体の他に、親水性高分子を含有させてもよい。反応層中に親水性高分子を添加することにより、電極系表面からの反応層剥離を防ぐことができる。さらに、反応層表面のわれを防ぐ効果も有しており、バイオセンサの信頼性を高めるのに効果的である。このような親水性高分子としては、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、メチルセルロース、エチルセルロース、エチルヒドロキシエチルセルロース、カルボキシメチルエチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、ポリリジンなどのポリアミノ酸、ポリスチレンスルホン酸、ゼラチンおよびその誘導体、アグリル酸およびその塩、メタアクリル酸およびその塩、スターチおよびその誘導体、無水マレイン酸およびその塩が挙げられる。特に、カルボキシメチルセルロースが好適に用いられる。酸化電流の測定方法としては、測定極と対極のみの二極電極方式と、参照極を加えた三電極方式があり、三電極方式の方がより正確な測定が可能である。

【0008】

【実施例】以下に、具体的な実施例を挙げて、本発明をより詳細に説明する。図1は、本発明によるバイオセンサの反応層を取り除いた概略平面図である。ポリエチレンテレフタレートからなる電気絶縁性の基板1上に、スクリーン印刷により銀ペーストを印刷し、リード2、3を形成している。次いで、樹脂バインダーを含む導電性カーボンペーストを基板1上に印刷して作用極4を形成している。この作用極4は、リード2と接触している。さらに、この基板1上に、絶縁性ペーストを印刷して絶縁層6を形成している。絶縁層6は、作用極4の外周部を覆っており、これにより作用極4の露出部分の面積を一定に保っている。そして、樹脂バインダーを含む導電性カーボンペーストをリード3と接触するように基板1上に印刷してリング状の対極5を形成している。電気絶縁性の基板には、ポリエチレンテレフタレートなどの合成樹脂板が用いられる。また、上記リードおよび電極の材料としては、銀やカーボン以外にも、白金、金、およびパラジウム等が用いられる。図2は、本発明によるバイオセンサの縦断面図である。図1のようにして電極系を形成した電気絶縁性の基板1上に、酵素類および電子受容体を含む反応層7を形成してある。

【0009】《実施例1》図1の基板1の電極系上に、グルコースデヒドロゲナーゼ（以下、GDHと略す。）とフェリシアン化カリウムの混合水溶液を滴下し、乾燥

させて反応層7を形成した。この反応層7内に含まれるGDHの量は、反応層1平方センチメートル当たり30ユニットであった。次に、反応層7上に、グルコース水溶液を滴下した。グルコースを含む試料液が反応層に供給されると、試料液内のグルコースは、グルコースデヒドロゲナーゼにより酸化される。そして、これと同時に反応層中の電子受容体が還元される。続いて、滴下した1分後に、対極5に対して作用極4に+0.5Vの電圧を印加して電子受容体の還元体を酸化した。そして、5秒後の電流値を測定した。この電流値は、生成した電子受容体の還元体の濃度、すなわち試料液内基質濃度に比例するので、この電流値を測定することにより、試料液内のグルコース濃度を求めることができる。試料として、溶存酸素濃度を約30mmHgおよび約180mmHgにそれぞれ調整した2種類のグルコース水溶液について、そのグルコース濃度を種々変化させた試料を用いた。その結果、得られた応答電流値とグルコース濃度の間には、一定の相関性があり、溶存酸素の濃度に関わらず良好な直線性を示した。

【0010】《比較例1》グルコースデヒドロゲナーゼの代わりに、グルコースオキシダーゼを用いる場合は、実施例1と同様にして反応層7を形成した。そして、実施例1と同じ試料を用いて、応答電流値とグルコース濃度の間の相関性を調べた。その結果、得られた応答電流値は、溶存酸素濃度によって差があり、溶存酸素濃度が高い方が、応答電流値が低くなる傾向が得られた。

【0011】《実施例2》図2の基板1の電極系上に、GDH、フェリシアン化カリウムおよびピロロキニリン（以下、PQQと略す。）の混合水溶液を滴下し、乾燥させて反応層7を形成した。この反応層7内に含まれるGDHおよびPQQの量は、反応層1平方センチメートル当たり、それぞれ20ユニットおよび4.5×10<sup>-5</sup>gであった。そして、実施例1と同じ試料を用いて、応答電流値とグルコース濃度の間の相関性を調べた。その結果、得られた応答電流値とグルコース濃度の間には、実施例1よりもさらに高い相関性があった。

【0012】《実施例3》図2の基板1の電極系上に、フルクトースデヒドロゲナーゼ（以下、FDHと略す。）とフェリシアン化カリウムの混合水溶液を滴下し、乾燥させて反応層7を形成した。そして、実施例1と同じ試料を用いて、応答電流値とグルコース濃度の間の相関性を調べた。その結果、得られた応答電流値とグルコース濃度の間には、高い相関性が得られた。また、これは試料液の溶存酸素に影響を受けなかった。さらに、PQQを反応層中に添加すると、応答特性がより高まった。

【0013】

【発明の効果】以上より、本発明によれば、血液、尿等の生体試料、食品工業における原料や製品などの試料中に含まれる基質（特定成分）を高精度で、迅速かつ容易

に定量し得るバイオセンサを得ることができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の一実施例におけるバイオセンサの反応層を除いた概略平面図である。

【図2】同バイオセンサの要部の縦断面図である。

【符号の説明】

1 電気絶縁性の基板

2、3 リード

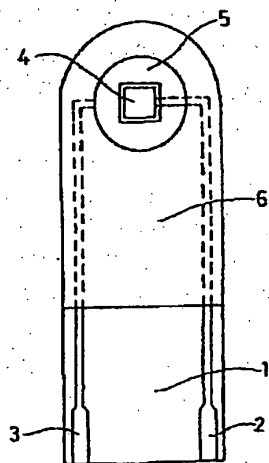
4 作用極

5 対極

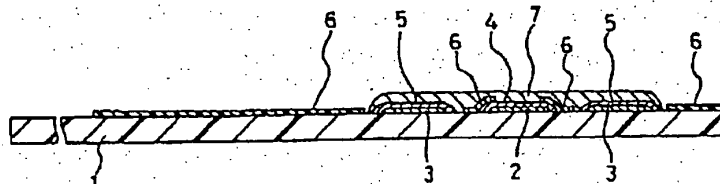
6 絶縁層

7 反応層

【図1】



【図2】



1: 電気絶縁性の基板

4: 作用極

5: 対極

7: 反応層